

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-506056

第6部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)7月7日

(51)Int.Cl.*
G 0 1 N 33/53
C 0 7 K 17/00

識別記号
V 8310-2J
8318-4H

F I

(21)出願番号 特願平4-505164
(36) (22)出願日 平成3年(1991)10月30日
(85)翻訳文提出日 平成5年(1993)4月30日
(86)国際出願番号 PCT/US91/08080
(87)国際公開番号 WO92/07952
(87)国際公開日 平成4年(1992)5月14日
(31)優先権主張番号 6 0 5 , 6 4 7
(32)優先日 1990年10月30日
(33)優先権主張国 米国(US)
(81)指定国 E P (A . T , B E , C H , D E ,
D K , E S , F R , G B , G R , I T , L U , N L , S
E) , A U , C A , J P

(71)出願人 イミュロジック ファーマシューティカル
コーポレーション
アメリカ合衆国 マサチューセッツ
02154 ワルサム, リンカーン ストリ
ト 610
(72)出願人 マーク アンド カンパニー, インコーポ
レイティッド
アメリカ合衆国 ニュージャージー
07065 ラークエイ, イー, リンカーン
アベニュー 126
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 MHC抗原によるペプチド結合検定法

(57)【要約】

本発明は、MHC糖タンパク質に対する小分子量の生体分子およびペプチドの親和性を測定する迅速かつ効率的で正確な検定法を提供するものである。本発明の方法は、溶液状態もしくは固体支持体にカップリングされたMHC糖タンパク質に対する検出可能なアゴニストと目的の候補体間の競合反応を使用し、次いで、MHCタンパク質とアゴニストとの複合体形成を検出する方法である。MHC糖タンパク質は、検定法を最適化するために、第2アゴニストで前負荷し得る。あるいは、本発明の方法は、MHC糖タンパク質から、前負荷されかつ標識されたペプチドの、目的の候補体による置換を使用する。複合体中のアゴニストの濃度は、感作されたT細胞の増殖に対する複合体の作用によって測定し得る。

請求の範囲

1. MHC結合タンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法であって、

反応混合物中に、細胞を含まない分散されたMHC結合タンパク質、該MHC結合タンパク質に結合して複合体を形成し得かつ該複合体中にあるときに検出し得るアゴニスト、および試験化合物を、

該試験化合物と該アゴニストが結合して該MHC結合タンパク質と結合する条件下で混合する工程；

MHC結合タンパク質に接觸されたアゴニストを未結合のアゴニストから分離する工程；および

該複合体中に結合しているアゴニストの量を、反応混合物中の試験化合物の濃度の関数として検出する工程を包含する方法。

2. 前記MHC結合タンパク質が、完全な質膜記列を欠く、請求項1に記載の方法。

3. 前記分離工程が、ゲル過濾法による、請求項1に記載の方法。

4. 前記反応混合物が、約4.5から8の範囲のpHで、そして約9.1から15の非イオン界面活性剤を含有する、請求項1に記載の方法。

5. 前記アゴニストが、ビオチンにカップリングされ、そして前記検出工程が、前記MHC複合体が標識を有するストレプトアビシンと反応することにより行われる、請求項1に記載の方法。

中の該試験化合物の濃度の関数として検出する工程を包含する方法。

1. 自記固体支持体が、MHC結合タンパク質に対する親和性リガンドを含有するよう改変された、請求項1に記載の方法。

2. 前記親和性リガンドが、MHC結合タンパク質に対して特異的な抗体あるいは免疫学的に反応性的そのフラグメントである。請求項1に記載の方法。

3. 前記アゴニストがビオチンにカップリングされ、および前記検出工程が、前記MHC複合体が標識を有するストレプトアビシンと反応することによって行われる。請求項1に記載の方法。

4. 前記標識が、蛍光、放射活性または酵素標識である。請求項1に記載の方法。

5. MHC結合タンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法であって、第1アゴニストを前記荷されたMHC結合タンパク質を、

該試験化合物および第2アゴニストが結合して該MHC結合タンパク質と結合する条件下で処理する工程；

該MHC結合タンパク質が、第1前記荷されたアゴニストで前記荷される工程；および

組の方針。

5. 前記標識が、蛍光、放射活性または酵素標識である。請求項5に記載の方法。

7. 前記分離工程が、前記複合体を固体支持体にカップリングすることにより行われ、前記固体支持体が、前記MHC複合体に対する親和性リガンドにカップリングされている、請求項1に記載の方法。

8. 前記親和性リガンドが、MHC結合タンパク質に対して特異的な抗体または免疫学的に反応性的そののフラグメントである。請求項7に記載の方法。

9. 前記アゴニストがビオチンにカップリングし、および前記検出工程が、前記MHC複合体が標識を有するストレプトアビシンと反応することによって行われる。請求項7に記載の方法。

10. 特定のMHC結合タンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法であって、

MHC結合タンパク質がカップリングされている固体支持体を、MHC結合タンパク質に結合して複合体を形成し得かつその複合体中にあるときに検出し得るアゴニスト、および該試験化合物を含有する、反応混合物によって。

該試験化合物およびアゴニストが結合してMHC結合タンパク質に結合する条件下で処理する工程；

該反応混合物を該固体支持体から除去する工程；および該固体支持体に結合したアゴニストの量を、該反応混合物

該複合体中に結合された第2アゴニストの量を、反応混合物中の試験化合物の濃度の関数として検出する工程を包含する方法。

11. 前記第2アゴニストがビオチンにカップリングされ、および前記検出工程が、前記MHC複合体が標識を有するストレプトアビシンと反応することによって行われる。請求項1に記載の方法。

12. 前記標識が、蛍光、放射活性または酵素標識である。請求項1に記載の方法。

13. 前記前記荷されたMHC結合タンパク質が、前記反応混合物を、前記荷されたタンパク質に添加する前に希釈されると、請求項1に記載の方法。

14. MHC結合タンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法であって、該MHC結合タンパク質を、該試験化合物を添加しながら置換可能な標識されたアゴニストで前記荷する工程。および

該試験化合物で置換された標識されたアゴニストの量を検出工程を包含する、方法。

15. MHC結合タンパク質複合体中に含有されている部分の存在もしくは濃度を、該部分で測定する方法であって、該複合体を、該部分で感作されたT細胞と接触する工程。および該T細胞の増殖の程度を測定する工程を包含する、方法。

16. 前記検出工程が、前記複合体を、前記アゴニストで感作されたT細胞と接触させ、そして前記T細胞の増殖の程

特表平6-506056 (3)

類別

NHC抗原によるペプチド結合検定法

技術分野

本発明は、特定の主要組織適合性遺伝子複合体の組タンパク質に結合する候補体部分の性能を測定する方法に関する。有効な候補体は、特定のNHC組タンパク質で構成される症状の治療剤として有用である。

発明の発明

免疫系は、哺乳類の種の安寧のために必須の器官であるので、免疫系がどのように作用しているのかを理解しようと試みる熱心な研究が行われている。ごく最近になって、主要組織適合性遺伝子複合体(NHC)の組タンパク質が、ヨリシバ球とTリバ球の応答に必須の役割を演じていることが決定された。NHC組タンパク質は、2つのタイプすなわちクラスIとクラスIIに分類されるが、それぞれのクラスにおいて、かなり異なる役割を演じていると思われる。加えて、クラスIとクラスIIの組タンパク質の構造は異なっている。構造が異なっているにもかかわらず、各々の場合に、免疫系が応答する抗原は細胞内に分解され、その抗原のフラグメントは、NHC組タンパク質と結合した細胞表面で発現されることが分かっている。NHC組タンパク質は多型性領域を有し、その領域の構造と関連して、かつ構に結合するペプチドに対してある程度の特異性を有する。したがって各NHC組タンパク質は、それが結合できる比較

均分子量の低い部分となる特異的レパートリーのみを有する。以下に述べる本発明は、この低分子量部分のレパートリーの固定に関する。

NHC組タンパク質ペプチド複合体はT細胞レセプターに提示されるが、T細胞レセプターは、自身が結合されるNHC組タンパク質と協同して、フラグメントを特異的に認識する。その結果、T細胞が刺激されてリンホカインを分泌し、そのためリンバ球が活性化する。

これらのフラグメントはリンバ球の活性化に不可欠のものであるので、特定のリンバ球の活性化を増大もしくは減少させる役割を演ずるペプチドもしくは低分子量の生体分子が作り出され得るかまたは見出され得る。このようにヨリシバ球およびTリンバ球の活性化は制御されて、特定の免疫応答を促進するもしくは抑制する。よって、リンバ球の応答を活性化もしくは阻害する有効候補体部分を固定できることは非常に重要であり、これらの固定部分は、自己免疫疾患、感染症、アレルギーなどの治療に有用となり得る。したがって、問題の特定のNHC組タンパク質を持つ可変な部分が決定されると、関連NHC組タンパク質が抗原部分を提示することにより構成される症状に有用な治療用化合物が提供される。

通常の結合検定法は、適切な候補体部分を固定することには適切でないと思われる。より一般的なリガンド/レセプターの結合とは異なり、部分/NHC組タンパク質複合体の生成速度は非常に遅いが、生成した複合体は安定である。その

結果、未変性の物質から得られるNHC組タンパク質は、内因性ペプチドの不均一な配列と結合するので、速度が非常に遅いととて実験するところを除いて、他の候補体部分と結合することを阻害される。単離されたNHC組タンパク質の約1%だけが他の候補的な部分を直接認識できる"オープニング(open for it)"であり、該開口部の約99%はすでに内因性ペプチドと複合していると確定される。

したがって、特定のNHC組タンパク質に対して多数の候補体部分を、迅速かつ効率的な手法でスクリーニングすることができる有効なリガンド結合検定法を考慮する必要がある。本発明は上記の目的を達成するためのいくつかのプロトコルを提供するものである。

既往文献

以下の文献が関連していると考えられる。すなわち、
Babbitt, "The Binding of Immunogenic Peptides to Is Histocompatibility Molecules", *Trans. 211卷, 359~361頁, 1985年; Buun, "Isolation and Characterization of Antigen-Tc Complexes in T-cell Recognition", *Cell. 11卷, 1971~1977頁, 1985年; Weiss および McConnell, "High Affinity Fluorimetric Peptide Binding to I-A⁺ in Lipid Membranes", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82卷, 5140~5144頁, 1985年; Busch, "Degenerate Binding of Immunogenic Peptides to HLA-DR Proteins on B-cell Surfaces", *J. Immunol. 143~144頁, 1990年; Roche および Crosswell,****

特表平6-506056 (4)

"High Affinity Binding of an Influenza Hemagglutinin-derived Peptide to Purified HLA-DW¹", J. Immunol., 144: 1115-1119頁, 1990年; ChenおよびParham, "Direct Binding of Influenza Peptides to Clean 1 HLA Molecules", Nature, 312: 745-748頁, 1985年; およびSollidら, "Physical Association Between HVC Class I Molecules and Immunogenic Peptides", Nature, 312: 475-477頁, 1985年である。

発明の範囲

本発明が提供する第1のプロトコルは次のとおりである。分散された可溶性HVCタンパク質を、検出可能なアゴニストがHVCタンパク質と複合体を形成することが分かっている条件下で、複合体部分の存在下において、該検出可能なアゴニストを処理する。生成した複合体を反応混合物から分離し、複合体中に含有されているアゴニストに対する複合体部分の作用を測定する。

本発明の第2のプロトコルは、例えば精製されたHVCタンパク質が容易入手できない場合に特に適しているが、以下のとおりである。HVCタンパク質を検定プレートに捕捉させて、可溶性HVCの代わりに結合検定用に用いる。この検定プレートは、例えば、抗-HVCタンパク質抗体またはHVCタンパク質に対して親和性を有する他の試薬に捕捉活性化されている。やはり、固定化HVCの検出可能なアゴニストとの結合に対する複合体部分の作用を測定する。

他のプロトコルでは、準備されたHVCタンパク質は、均一なペプチド配列が前負荷され、その結果、すでにキャップシグナルされたHVCタンパク質の均一な集団が提供される。前負荷されたペプチドの解離反応が、別の複合体部分の結合反応の準後進律である場合、この方法は、反応速度を制御して、検出可能なアゴニストと複合体間の均一な競争を保証することができる。さらに、生成したHVC複合体を希釈すると、前負荷されたペプチドの解離が速くなり、そのため、アゴニストもしくは複合体に結合する"中空ポケット (empty pocket)" (すなはち利用可能なドメインまたは結合部位) を生成する。均一な前負荷されたペプチドとしては、HVCタンパク質によって比較的容易に生成される。したがって検定に要する時間が短くなるものを選択することが望ましい。

その他のプロトコルでは、準備されたHVCタンパク質に、このタンパク質からの解離速度が他のペプチドの存在によって影響されることが分かっている複数ペプチドを前負荷する。そして、HVCタンパク質からの複数アゴニストの解離もしくは複数の反応を加速する試験化合物の性能を測定する。

さらに、アゴニストおよび/または複数体部分との複合体の形成を検出するのに有用な手段は、T細胞刺激に対する複合体の作用を測定することである。

したがって、1つの意匠において、本発明は、HVCタンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法に関するものであって、該方法は、反応混合物中に、セルフリー分散HVCタンパク質と結合して複合体を形成し、かつその複合体中にあるときは検出ができる可溶性アゴニスト、および試験化合物を含む反応混合物で、試験化合物と前記アゴニストが結合されたHVCタンパク質と結合する条件下で、処理する工程: HVCタンパク質に捕獲されたアゴニストを未結合のアゴニストから分離する工程: および、複合体中に結合されているアゴニストの量を、反応混合物中の試験化合物の濃度の閾値として検出する工程: を包含する。

第2の意匠において、本発明は、特定のHVCタンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法に関するものであって、該方法は、HVCタンパク質が結合されている固体支持体を、HVCタンパク質と結合して複合体を形成し、かつその複合体中にあるときは検出ができる可溶性アゴニスト、および試験化合物を含む反応混合物で、試験化合物と前記アゴニストが結合されたHVCタンパク質に結合する条件下で、処理する工程: 前記反応混合物を固体支持体から取り出す工程: および、前記固体支持体に結合したアゴニストの量を、反応混合物中の試験化合物の濃度の閾値として検出する工程: を包含する。

第3の意匠において、本発明は、HVCタンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法に関するものであって、該方法は、第1アゴニストを前負荷されたHVCタンパク質を、前記HVCタンパク質と結合して複合体を形成し、かつ前記複合体中にあるときは検出ができる第2アゴニスト、

および試験化合物を含有する反応混合物で、試験化合物と第2アゴニストが結合してHVCタンパク質と結合する条件下で、処理する工程: 前記HVCタンパク質は、該反応混合物を添加する前に前負荷したアゴニストで前負荷され、かつ希釈された工程: および、複合体に結合された第2アゴニストの量を、反応混合物中の試験化合物の濃度の閾値として検出する工程: を包含する。

第4の意匠において(解離速度検定法)、本発明は、HVCタンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法に関するものであって、該方法は、反応混合物中に、複数アゴニストを前負荷されたHVCタンパク質、および試験化合物を混合する工程であり、前記の前負荷された複合体の解離速度は他のペプチドの存在によって影響されるることはわかっているもの: および、試験化合物が存在するときと存在しないときとの上記の前負荷された複合体の解離速度を比較して、試験化合物によって加速されたオフ速度 (off rate) を検出する工程: を包含する。

第5の意匠において、本発明は、HVCタンパク質複合体中の(複合体)部分の存在を検出する方法に関するものであって、該方法は、前記複合体を前記部分で感作された難溶性の培養物と接触させて、前記T細胞の存在、不在、または増殖量を検出する工程を包含する。

認定の原産地指照

図1は、D446V1との結合について、未標識EA307-E19が標識

HA307-318と組合的であることを示す代表的阻害曲線である。

図2は、抗核物から、抗体でコートされた微量測定プレートによって検出されたB4104を用いる、標識HA307-318の結合曲線を示す。

図3A、3Bおよび3Cは、B4104 NEC標シアンパク質に前負荷した後、種々の試験ペプチドについて測定した“オフ速度”を示す。

図4Aと4Bはそれぞれ、前負荷されたNEC標シアンパク質および対照NEC標シアンパク質に対するRMP9S-102ペプチドの結合曲線と阻害曲線を示す。

図5Aと図5Bはそれぞれ、HA307-318が存在しない場合と存在する場合の、ビオニル化RMP9S-102とビオチニル化BSF-14の解離曲線を示す。

図6は、ビオニル化BSF-14のRMP9S-102による変換曲線を示す。

図7は、検出されたペプチドの検定法として、感作T細胞の増殖を用いたHA307-318ペプチドの結合曲線を示す。

発明の実施範囲

数種の有効な検定方法を用いて、検出可能なアゴニストと既存の接合体部分との間の結合を利用し、特定のNEC標シアンパク質に対する該接合体の結合を測定する方法および該抗体を提供する。

解離速度検定法を除く、本発明のすべての方法では、検出可能なアゴニストと接合体間に競合が行われる。その場合、

少なくとも1つの濃度および好ましくは種々の濃度の接合体部分の、検出可能なアゴニストの結合に対する作用が測定される。

解離速度検定法では、前負荷されたNEC/標識アゴニスト複合体の解離速度に対する。少なくとも1つの濃度および好ましくは種々の濃度の接合体部分の作用が測定される。

検出可能なアゴニストとは、試験される待機中のNEC標シアンパク質に結合できることがわかっているペプチドなどの低分子量化合物を意味する。DE対立遺伝子に対して有用なアゴニストとしては、例えばHA307-318の位置で表されるような赤血球凝集素由来のペプチド(HA307-318) (Jpn. Lincepol. 1卷, 44-1頁, 1995年) がある。DE対立遺伝子のNEC標シアンパク質産物を検出することが分かった他の有用なアゴニストには、固定はないが、HADF 3.2, RPPAAAYAAA; HADF 3.5, RPPAAQYAA RAAA; HADF 5.0-102, RPPENWVTPPTPA; RSP 3-14 (EIS E10), RYGLTYAVIG; RSP 3-14 (EIS E12), RYGLTYAVIG およびこれらを組み合った変形体が含まれる。有効なアゴニストとしては、上記ペプチドおよびそのアミノ terminal の電荷が放出された等価物が含まれる。いくつかのアゴニストは、百日咳毒素E1-43, ブタクサミ50-62、およびシングルエンザ・マトリックスE1-10のように対立遺伝子特異的である。

アゴニストには一般に、NECと結合したとき容易に検出できるような方式で標識が付けられる。しかし、混合したペプチ

ドを測定する丁相細胞増殖検定法について記載したように、検出がアゴニストの性質にのみ依存した方法で行われる場合は、外因性の標識付けを行う必要はない。したがって、アゴニストは接合体中にあるときは、検出可能であることをのみが必要である。

しかし、アゴニストが標識によって検出される場合は、標識は種々の形態をとり得る。したがって、放射性同位元素、ビオチン、蛍光剤、化学发光剤などのような種々の標識が用いられる。標識の選択は、主として、簡便さ、感度、バッタグラウンドの最小化、NEC標シアンパク質に対するアゴニストの結合への干渉の減少などをに基づいて行われる。一般にアゴニストの濃度は、NEC標シアンパク質の濃度の約0.1~5倍である。

特に好ましい標識はビオチンである。ビオチンは“標識”として用いる場合、多種の標識で層に標識付けがなされるストレプトアビシンが検出に用いられる。したがって、ストレプトアビシンは、放射性同位元素、蛍光剤、化学发光剤、酵素、コロイド粒子などで標識が付けられる。どの標識を採用するかは、上記のように種々の検討を行って決定される。

問題の接合体部分の濃度は、媒質中に存在するアゴニストの濃度、および接合体とアゴニストの相対親和性によって変化する。通常、接合体の量は、媒質中に存在するアゴニストの量とは、約100倍以上まで異なることはない。

本発明の方法によれば、種々の成分(例えば、NECシアン

パク質、アゴニストおよび試験化合物)を混合し、混合物が平衡状態に達するまで十分な時間静置しておく。一般に濃度は約1%である。通常、平衡に達する時間は少なくとも約0.5時間で、より一般には約12時間であり、一般に約1時間を超えない。濃度測定を利用して測定することができる。複数の試料が用いられ、かつ各試料が接合体の生成量についても評価される場合、通常は接合体の濃度を反復して一回測定するだけでよい。

適切な接合体部分としては、問題のNEC標シアンパク質をプロテクトすると考えられる低分子量の物質が含まれる。一般に、これらの接合体は、アミノ酸が5以上のオーダーのペプチドまたはこのようないかべペプチドのコンホメーションを構成する低分子量の生体分子である。広範囲にわたる接合体が、現在活動している合理的な医薬設計の分野で広く知られている。接合体の範囲は医薬的制限はないので、活性であると推定されることは必ずしも接合体の構造を示す。

1つの方法は、溶解状態の可溶性NEC標シアンパク質が接合体生成反応に使用される。NEC標シアンパク質と混合した接合アゴニストが溶解アゴニストから分離され、次いで、混合したアゴニストの量が、接合体のNEC標シアンパク質に対する親和性の尺度として測定される。この方法は、多數の接合体をスクリーニングし、NEC可溶化NEC標シアンパク質に対する接合体の親和性に関する値を得る迅速、簡単かつ正確な技術を提供する。この様は、前記NEC標シアンパク質が細胞膜中のそれらの天然の位置にある場合にみられる親和性に開港があると考えられる。

特表平6-506056 (6)

様である。

この方法を実施する際には、MHC種タンパク質が細胞膜を含有しない天然度の二重体の総タンパク質であるか、または更に複数領域を欠く可溶性総タンパク質である場合、MHC種タンパク質の溶解が問題となる。可溶性総タンパク質は複数の方法で測定される。クラスIIのMHC種タンパク質のα鎖とβ鎖またはクラスIのMHC種タンパク質の鎖をコードする遺伝子が真菌領域の全部または一部を除去することによって細胞を切り替える場合は、組換え法を用いる。好ましいことは、真菌記列は、難治に連結できる領域と置換され得る（例えばCorazzaら、*Infect. Immun.* 12:800, 1977年; Tyroskisら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:15, 1982年参照）。その結果は次に、適切なエヌシーラーザ、例えばホスファチジルイノシトール特異的ホスカリバーゼCで除去され得る。MHC種タンパク質の濃度は、一般的に約0.01~50μg/ml範囲内にあり、より一般に約0.1~1μg/mlである。この範囲は利用しやすく、かつ臨床的なものではない。というには、いくつかの試験では、結合される混合物の親和性、使用される部分の濃度などによって、上記範囲より高いあるいは低い濃度を用いる方が安ましい場合があるからである。

媒体は、一般的に約10~20μMの調節剤の濃度によって、ほぼ生理的pHの4.5~8、好ましくは約5~6.5に維持される。他の附加物は、塩酸約10~20mMの濃度で、または非イオン界面活性剤を含有し得る。非イオン界面活性剤は、一般的に約0.1~

1%の濃度で含有される。ペプチドアゴニストを用いる場合そのペプチドは、一般に少なくとも約3つの、多くとも約30までのアミノ酸からなるものであり、好ましくは約5~16のアミノ酸。さらによい場合は約5~15のアミノ酸からなる。

十分なMHCアゴニスト複合体が形成されたならば、その複合体は種々の方法で分離され得る。その複合体は、ゲル沈降法、非選元性 SDSボリアクリルアミド中のゲル電気泳動法、またはMHC種タンパク質に対して特異的な抗体もしくは他の親和性試薬（リガンド）でコートしたプレートに複合体を結合させることによって、逆離アゴニストから分離され得る。ゲル分別法（gel fractionation）には、セファデックスG-50が有用であることが知られる。ゲル電気泳動法には、非選元性条件下的12.5% SDS-PAGEゲルが十分であることが知られる。

しかし好ましくはアフィニティ分離法、特に抗体分離法が、好ましくはプレート上で、特に多くのウエルを具備するプレート上で用いられる。例えば、MHC種タンパク質のサブユニットの1つの定常態に対して特異的な過剰な抗体もしくはそのフラグメントを用いることによって、アゴニストとMHC種タンパク質との間の複合体を捕捉し得る。次に、非特異的に結合しているかもしくは結合していない複数のアゴニストを洗浄して除き、残りて、表面に結合して存在しているアゴニストを検出することによって、表面に結合したアゴニストの量を定量し得る。洗浄は、複合体を生成させるのに用いた媒体を含むする便利な緩衝液で実施され得る。アゴニストをビオ

チンで標識をつける場合、標識アビダン用いることによって、單一のアゴニスト-MHC種タンパク質複合体に結合された複数の標識が得られ得る。アビダンについて特に重要なのは蛍光標識の使用であり、とりわけラッタニド（希土類元素）キレート化合物、さらにとりわけユーロピウムキレート化合物、または酵素。特に西洋ワニのバーオキシダーゼの使用である。これらの標識は通常の手法に従って定義され得、ランクニドキレート化合物からの蛍光を検出する多數の蛍光分析器、および発色团をもたらすバーオキシダーゼの基質を検出する分光光度計が用いられる。

第2の方法は、複合体が、緩衝液中に存在するMHC種タンパク質と複合体を形成する性能を測定するに特に有用であるが、この方法では、問題のMHC種タンパク質はまず固体支持体に捕獲され、溶解液の残りの成分は支持体に吸着されたMHC種タンパク質を除去して洗浄される。次に、カップリングされた支持体は、MHC種タンパク質および結合する接觸的部位と複合したときに検出できるアゴニストを含有する反応混合物で処理される。アゴニストの標識の標識と、必要であれば反応混合物中の結合物質の濃度の測定は、可溶化MHC種タンパク質の使用に関する記載のものと類似している。

誘導化された固体支持体は、当該技術分野で公知の標準技術によって、簡便のMHC種タンパク質に対して特異的な親和性試験の受動的吸着または共有結合カップリングにより調製される。一般に、微量薄層プレートまたは他の多孔性のウェル

を具備する反応マトリックスが固体支持体として使用される。この方法は、捕獲体および/またはアゴニストのMHC種タンパク質との結合を妨害することがある夾雑物を粗略解剖から除外するという利点がある。このような夾雑物の活性は最小にしなければならない。というのは、溶解物中に存在するプロテアーゼなどが活性を示す場合、アゴニストのMHC種タンパク質との結合は高濃度下でのみ起こるからである。

したがってこの方法では、適切な量のアゴニストおよび捕獲体を含有する反応混合物は、固体支持体に結合されたMHC種タンパク質の存在下で適切な期間、通常約3~4時間インキュベートされる。インキュベート期間が終わってから、固体支持体を反応混合物から取り出し、洗浄し、そしてMHC種タンパク質に結合したアゴニストは上記の標識の性能によって測定される。

第3の方法では、第1の結合プロトコルが用いられるが、MHC種タンパク質を、均一な通常ペプチドアゴニストで前負荷することによってさらに最適化され得る。この方法は、アゴニスト/複合体の組み合せの結合を行うことができる適切なオフ濃度を有する。この方法では、捕獲MHC種タンパク質もしくは粗略解剖物が、前負荷するアゴニストとともにインキュベートされる。一般にオクタデカルゴンコシドを含有する適切な緩衝液中で、未変性MHC種タンパク質中に含有される不均一な内因性ペプチドを、前負荷する均一な部分で置換するのに充分な時間、一般には一晩インキュベートされる。前負荷されたMHC複合体は次に希釈されて、上記の検定系に用いられる。

特表平6-506056 (7)

この方法は、アゴニストもしくは被検体と結合もしくはカップリングを行う“中空”NHC錯シバク質結合ドメインを均一に提供する。一般に被検体またはアゴニストの結合反応の律速段階を他の方法ででも促進すると、検定時間が短くなり、被検体の結合速度と振れ性をより正確に測定し得る。入ってくるアゴニストもしくは被検体が前負荷された部分を退出することが不要な場合は、前負荷各部を与えることによって、負荷されていないNHC錯シバク質に対する結合体の振れ性はより容易に比較され得る。NHC分子は、既知の解離速度を有するペプチドで前負荷されるので、検定は、より短い時間で好ましくは3時間で実施される。

第4の方法では、NHC錯シバク質は、他のペプチドの存在下で置換されることが証明されている、均一な標識ペプチドアゴニストで前負荷される。この方法では、標識されたNHC錯シバク質は標識アゴニストとともにインキュベートされる。一般にオクタペプチドを含有する細胞液中で、不均一な内因性ペプチドを、前負荷する部分で置換するのに充分な時間、一般には一夜インキュベートされる。前負荷されたNHC複合体は次に、置換する被検部分の溶液で約3時間希釈し、次に、被検的部分がある場合およびない場合のカウントの喪失を上記のようにして監査する。

本発明の別の形態では、結合検定用に用いられるアゴニストに標識を付ける必要がない。この方法では、複合体は、感作されたT細胞とともにT細胞増殖検定法で用いられる。感

作されたT細胞の増殖促進は、複合体に対するアゴニストの結合の尺度である。またこの方法は、T細胞を試験部分で感作することによって、複合体内のいずれの試験部分ともの検出が用いられる。

以下の実施例は例示を目的として提供するものであって本発明を限定するものではない。

実施例1

HLA-B27およびB22シバク質の検定

抗DR(LB3.1)および抗DQ(IVD12)のアフィニティーカラムを、琪形セロース樹脂(Amicon)および上記の各抗体4mgづつで調製した。カラムに結合する可溶化クラスIIの最大量は、結合された抗体のモル濃度の2倍である。よって、4mgの免疫グロブリンは、多くてもクラスIIのNHC錯シバク質の32ngしか捕獲できない。実際には、アフィニティーカラムの理論的容量の10~10%しか結合できず、これはDQとDQの3~5ngに相当する。LB3.1とLB3.1のカラムの比較を、 1.8×10^{-12} の細胞のIF-40界面活性剤による洗出物を等しく分割して各カラムに負荷し、pBL1.1の細胞液に5分間または15分間さらして溶解することによって実施した。収量は次のとおりである。

(以下余白)

	5'漏出	15'漏出	全収率	
	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)
LB3.1	1.8	0.885	2.69	
LB3.1	2.10	2.02	4.12	6.81
IVD12	1.37	2.21	4.58	4.58

*BSAを標準として用いたBCA検出法により測定した。

(以下余白)

実施例2

ゲル通過による放射性ペプチド-NHC
複合体の透析ペプチドからの分離

ヨウ素化されたBA107-119アナログ(2μM)を、HLA-B24bv(2μM)とともにPBS/1%オクタペプチドコシド中で一夜インキュベートし(合計容積は50μL)。反応混合物を25μLのウツフックテクス-50カラムに加えた。漏出(0.5μL)をPBS/1%オクタペプチドコシドで洗浄し、計数した。放射能標識をかけたペプチドの溶出範囲も決定した。ペプチドを含有しない複合体に起因していると考えられるピーカが、約40~50相对洗出量%に観察された。このピーカはペプチド剥離がなされた場合には認められなかった。

実施例3

抗体をコートしたプレートを用いて行う
複合体の透析ペプチドからの分離

* 放射性ヨウ素化したBA107-119アナログ(2μM)を、50μLの容量中、複合体としてBA107-119を含有しているかまたは含有していないPBS/1%オクタペプチドコシド中で、2μMのDR4bv(4)とともに一夜インキュベートした。同時に、ミクロウェルプレートを、4°Cで一夜 LB3.1でコートし、PBS/0.05% Tween / 0.1% BSAで洗浄し、4°CにてPBS/5% FCSでブロクした。次に、50μLのPBS/1% オクタペプチド/5% FBSを各ウェルに添加し、次ぎにペプチドとクラスII NHC錯シバク質のインキュベーション混合物50μLを添加した。1時間インキュベートし

特表平6-506056 (B)

た後、プレートを洗浄して計数した。

b) アラメダ培養がビオチニル化された、インフルエンザ赤血球凝集素の粗基 $\text{HA}107-311$ に相当するアグニスト($\text{HA}107-311$)を、アフィニティ精製したDB4Dv4(2 μM)とともにPBS/ $15\text{ }\mu\text{g}$ オクタグルコシド中にインキュベートした。ペプチド/DE複合体を、 $25\mu\text{l}$ のPBS/1%オクタグルコシド(IFPC5)と $10\mu\text{l}$ のインキュベーション混合物を、抗体でコートしたマリザ(ELISA)プレートのウェルに添加したことを除いて、ヨウ素化EAと同様に、連鎖ペプチドから分離した。1時間インキュベートした後、プレートをPBS/0.05%Tween/0.1%BSAで洗浄し、結合した $\text{HA}107-311\text{O}^{125}\text{I}$ 量を、 ^{125}I ストレプトアビシン(4-30 $\text{k}\mu\text{g}/\text{ウェル}$)とともに4℃で1時間インキュベートし、次に、洗浄し、計数することによって定量した。

c) ビオチニル化 $\text{HA}107-311$ のDB4Dv4との結合に対する結合率、PBS/1%オクタグルコシド中、いくつかのH4モノ置换ペプチド(例えば101位のlys, serあるいはphe)(200 μM)がある場合またはない場合について、上記(b)と同様に行なった。抗体LB2.1の場合、DE抗原存在下で既報された計数値はバッケランドと比べて2倍であったが、一方非放射性競合体の存在下では、計数値はバッケランドより顕著に低かった。抗体YD12の場合、DEの存在下で既報された計数値はバッケランドより低かった。限界曲線の代表的な結果を図1に示す。

実験b)については、放射性ペプチドとDE抗原の結合を除いて、実質的にシグナルは観察されなかった。

実験例4

組合実験c)では、点滅法(すなわち101位でのリシンあるいはセリン)を含む有するアグニストに相当するペプチド競合体の場合、計数値はバッケランドとほぼ同じであった。一方非放射性ペプチド $\text{DB}107-311$ または101位にフェニルアラニンが存在する場合、実質的に放射能を検出されなかつた。

実験例5

ビオチニル化赤血球凝集素アグニストのDB4Dv4

との結合に対する非放射性および放射性検出

シグナルの比較

検定は、EAのビオチニル化アラニンバックボーンのアグニスト(AAPEKAKAKAAAGA) $\text{DB}107-311$ とDB4Dv4 0.5 μM を用い、実施例3に記載したと同様に行なった。ペプチド/DE複合体を、連鎖エーロビウム結合ストレプトアビシン、西洋ワスピベルオキダーゼ結合ストレプトアビシンあるいは ^{125}I 結合ストレプトアビシンを用いて定量した。各々の染色試薬を滴下して、バッケランド最高値を越える最大シグナルを得た。

実質性エーロビウムトレースで標識付けたストレプトアビシンの場合、 ^{125}I ストレプトアビシンで見られたのと同じ大きさのシグナル/ノイズ比(80-100:1)を既報した。西洋ワスピベルオキダーゼ結合ストレプトアビシン結合体で得られたシグナル/ノイズ比(10-20:1)をまた既報した。

実験例6

組合物中の特異的結合の検定

DEクラスII分子 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $200\mu\text{l}/\text{ウェル}$ に対して特異的な

モノクローナル抗体LB2.1を、コスター(Coster)EIA-EIAプレートに、 50nM トリス-HCl pH 9.0中、 4°C で一夜あるいは 37°C で1時間コートした。プレートを洗浄し、5%PCS/洗浄液を用いて室温で1時間ブロッキンし、次にダイターテックプレートウォッシャー(Titertek plate washer)を用いて、0.05%Tween 20/0.01%アジフ/ PBS(洗浄緩衝液)で $\times 4$ 回洗浄した。次に、約20nMのDE H4Nクシナバク質を含有すると考えられる難溶解物を、上記のコートされたプレート上に $\times 4$ 回インキュベートした。そのプレートを、0.05%Tween 20/0.01%アジフ/PBSで $\times 4$ 回洗浄した。次に、ビオチニル化EAペプチド $107-311$ 、 $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ オクタグルコシド(OG)/PBS中、 $200\mu\text{l}/\text{ウェル}$ で、プレートに添加し、CO₂インキュベーターで 37°C で一夜インキュベートした。

プレートを洗浄緩衝液で $\times 4$ 回洗浄し、 $200\mu\text{l}/\text{のユーロビウムでキレートしたストレプトアビシン(Pharascia/LIB 8 units)/50ng/ml$ とともに 4°C で1時間インキュベートした。一回追加の洗浄サイクル後、プレートを、 $200\mu\text{l}/\text{ウェル}$ の12.34アルフィリナチ(Quintix research)蛍光光度計(Pharascia/LIB)での検出のために、結合ユーロビウムが放出する促進溶液(Pharascia/LIB)、30分間溶解で処理した。

代表的な結果を図2に示す。難溶解物 H4N をテクノベック質(白九印)あるいはDE4Dv4でトランスクレクトされたCoat細胞由来の溶出物(白四角印)を用いて、H4Nテクノベック質を得たときと同様に、Friesz難溶解物(黒九印)を使用したと

きも、ビオチニル化 $\text{HA}107-311$ ペプチドの濃度に比例する結合曲線が得られている。対照として使用したMockトランスクレクトCoat細胞(馬四角印)は標識付きペプチドの吸込みを全く示さなかった。

実験例7

相互のプレート検定法のプロトコル

この検定法は、抗体をカッピングしたプレートを調整したこととを除いて実施例5に述べたのと類似の方式で以下のように実施した。

既報された抗体をその表面に共有結合するAv14-32TMプレート(Dioprote International)を用いた。まず第1にLB2.1モノクローナル抗体を、 50nM 脱酸素液波 $\times 5$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ まで標記し、次に $1/10$ 容量の新しく調製した 10nM メタコウ酸ナトリウムを添加することによって脱酸素化した。室温で30分後、脱酸素液波中、 20nM エチレンギリコールの $1/10$ 容量を添加することによって反応を停止させた。 115 ± 10 の脱酸素液波を、Av14-32TMプレートのウェルに添加し、 4°C で一夜インキュベートした。次にそのプレートを洗浄液(PBS/0.05%Tween 20/0.01%アジ化ナトリウム)で $\times 4$ 回洗浄し、次にPBS/5%PCS/0.01%アジ化ナトリウムを用いて 4°C で1時間ブロッキングした。

PBS/0.75%オクタグルコシド/0.01%アジ化ナトリウム(結合緩衝液)中の、 20nM DE4Dv4 12 μg (各ウェルに添加し、 4°C で4時間インキュベートした。プレートを洗浄緩衝液で

特表平6-506056 (9)

回洗浄し、結合緩衝液を含有するビオチニル化 EA307-319 ベブチドの 125 μl で処理し次いで PBS で一晩インキュベートした。そのプレートを洗浄緩衝液で 4 回洗浄し、次いでエーロビクムでキレート化されたスクレットアビジン 500 ng/ml (Pharmacia/LKB) の 125 μl とともに 4°C で一夜インキュベートした。1 回追加洗浄サイクル後、プレートを 125 μl/ウェルの促進液 (Pharmacia/LKB) で湿室にて 1 時間開封し、1234 デルフィアリサーチ (Delphi research) 受光光度計で読み取った。

実施例 5 と類似の結果を得た。

実施例 7

前負荷された HEC 複合体の使用

適切な前負荷するペプチドを決定するためにオフ速度でいくつかの候補の前負荷するペプチド：すなわち RPPENITPRTPA の配列を有するラットのミエリン酸性タンパク質 50-102 (EMBP90-102); RPPAAAYAARAAA の配列を有する RA 由来タンパク質 1-2 (RADP3, 2); および RPPAQAYAARAAA の配列を有する RA 由来タンパク質 3, 4 (RADP3, 4) について測定した。標識付た前負荷するペプチド 50 nM 和、PBS pH 7.0 結合緩衝液中、400 nM の D94 04 とともに 4 時間インキュベートした。複合体を、PBS で 1:40 に希釈し、および未標識の EA307-319 の種々の濃度を、種々の倍率に希釈し、次いで上述のように LBS, 1% カップリングさせた抗体プレートに、複合体を捕捉させることによって測定した。図 3A～3C に示すように、どの試験ペプチドも、オフ速度が EA307-319 の存在によって影響を受けることを示さず、EBS

F90-102 の解離速度は上記 3 つの中でも遅かった。従って、この検定に用いるために、EMBP90-102 による前負荷を選択した。

この検定では、2 μM の標識 D94 04 と 1 μM の EMBP90-102 を、上述のように PBS 0.75% オクテルグルコシド/0.01% アジナトリウムの結合緩衝液中で一晩インキュベートした。

抗体捕獲プレートは、125 μl の 2 mg/ml LBS, 1 を用いて 4°C にて一晩で開封し、洗浄し、上述のようにプロッタした。

前負荷された複合体 (すなわち D94 04/EMBP90-102) を 1:100 に希釈し、種々の濃度のビオチニル化 EMBP90-102 とともに、種々の量の未標識の同じペプチドの群下でインキュベートした。対照として用いて用いた。希釈された前負荷されていない DE HEC 複合体質もまた同様に処理した。

反応混合物の一部 (10 μl) を捕獲プレートに移し、4°C で 4~24 時間インキュベートした。そのプレートを上述のように洗浄し、次いで、検定緩衝液 (カルシウムとマグネシウムを含有しない PBS+0.5 mM, 0.1% アジナトリウム中 20 μM のジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA)) 中、50 ng/ml エーロビクムーストレットアビジンの 125 μl で処理し、4°C で 4~24 時間インキュベートした。追加の洗浄を行った後、プレートを上述のように増強して読み取った。

代表的な結果を図 4A と 4B に示す。図 4A は、対照としてのビオチニル化 EMBP と、前負荷された DE の結合曲線を示す。図 4B

は、未標識 EMPT の種々の濃度を用いて得た屈折率百分率を示す。上述のように、結果は、前負荷された DE HEC 複合体質と前負荷されていない DE HEC 複合体質について類似している。試薬を滴下した後、0.1 M PBS で pM を 5.5K 前負荷されたカルシウムとマグネシウムを含有していない PBS 中、37°C で一夜インキュベートすることによって、2 μM D94 04 に 150 nM EMBP90-102 を前負荷して、スクリーンが生なることを測定した。前形成された複合体は、1/40 に希釈し、標識付たアガニストと試験化合物を 3 時間反応させた。このようにして複合体を上述のように捕捉した。

実施例 8

リガンド/複合体の解離速度の検出

リガンド/受容体の解離速度が、存在する複合体の濃度にのみ依存している場合は、一次反応である。クラス 11/ペプチドの解離速度を測定すると、その反応はいくつかの場合で是一次反応であるが、すべてが一次反応ではない。

解離速度を測定するために、400~500 nM の D94 04、50 nM ビオチニル化 EMBT あるいは 25 nM のビオチニル化 EMBP (マイコバクテリウム・ツベルクリンス (Mycobacterium tuberculosis)) 由来の 191D の熱ショックタンパク質 3-14) とともに、先に述べたように、37°C で一夜インキュベートした。これらの前形成された複合体は、次に、EA307-319 の濃度を変えるか、あるいは変えることなく緩衝液で 100 倍に希釈した。図 5A に見られるように、EMBP の解離速度は第 2 のペプチドによって影

響されない。しかし、図 5B に見られるように、EMB の解離は他のペプチドの存在によって加速し、その解離速度は、他のペプチドの濃度にとどまって増加するのでこの解離は明らかに一次反応ではない。

これは直線モデルを示すし、この場合第 2 ペプチドは第 1 ペプチドを押す。従って、第 2 の前負荷されるスクレットアビジン検定では、100 nM の D94 04 と 5 μM のビオチニル化 EMBP-14 を上述のようにインキュベートした。複合体を、結合部の挿入部分を含有するか、あるいは含有していない緩衝液で 40 倍に希釈して、直線を 30 分間、計数値の減少によって測定した。図 5 はペプチド結合体 (EMBP) による直線を示しているが、どんな小さな分子も潜在的に同じ作用を持っている。

実施例 9

合成された T 細胞母細胞による検出

EA307-319 に対して特異的に反応性の T 細胞クローンを、ELA [クラス 1] に表現型の D94 04, D27, D95 04, D96 04 を有する細胞から選択した (実施例 1 に記載されているように行った)。簡単に述べると、末梢血由来の单核細胞を、ストレットアビジン (100 μg/ml)、ベニシリン (100 U/ml) および 5% のブーラードした AB 血清 (Whittaker Frederickburg, MD) を補足した RPMI で、1/100 に希釈したインフルエンザワクチン (Falken Da vits) を用い、インピトロで感染させた。SKCO で 3 日間 37°C でインキュベートした後、T 細胞の細胞芽を、 ± 1 あたり 10^6 の同種異系 T BMC (300g 制限)、B 細胞に形成されたオートログ

特表平6-506056 (10)

ス EBV の 10⁵細胞 (500 μ 照射)、インフルエンザウイルスワクチンの 1/100希釈、および 1 μ g/ml のロイコアグドチニン-L (Pharmacia 社) を含有する。フィーダー混合物の存在下、3 ウエルあたり 1 細胞に希釈を割当することによってクロントした。懸濁液を、32 ウエルの平底微量濃度プレートにプレートし、上述したようにインキュベートした。増殖培養物を 24 ウエルの組織培養プレートに移し、同じフィーダー混合物で再刺激した。3 日後、10% FBS を添加し、細胞を凍結するかまたはさらに再刺激によって膨張させた。特異性を HA307-319 で測定した。

DRAWn 錠タンパク質を、実験例 1 に記載されているようにして、Prisus EBV-3 細胞からアフィニティー精製した。簡単に述べると、該細胞はウシ胎児血清で捕足した RPMI 細胞で増殖させて遠心分離で集め、PBS で洗浄し、1% Nonidet P-40 で溶解した。細胞断片を遠心分離で取り除き、生成した清液を用、製造者の指示にしたがって、10ug の抗体を 1ml のマトリックスセルファインカルミル (Matrix Cellulose Formyl) (Aldrich) にカッピリングすることによって調製したモノクローナル抗体 L83.1 セルロースカラムに直列接続したセファロース CL-4B カラムへ直列接続した。これらのカラムを、10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% デオキシコロイドの 25 倍容量で洗浄した。次に L83.1 セルロースカラムをカラムの 5 倍容量の 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1% SDS で洗浄し、30mM グリシン pH 11.5, 1% SDS で溶解した。得られた部分はそれぞれ pH 2 の 2m

グリシンで pH 7.5 に調節した。全量を、10mM Tris-HCl, pH 7.5 100 μ l に対して透析を行い、4°C で貯蔵した。

MIC 錠タンパク質/ペプチド複合体を調製するために、精製 DRAWn 錠、150mM PBS 中 HA307-319 を種々の濃度で、37°C で一夜インキュベートした。50 μ l の該混合物を、1 μ g/mg × 10LBS 1.1 含有の 50mM Tris-HCl, pH 8 中で 4°C にて一夜インキュベーションして、HA307-319 でコートされた 32 ウエルの平底エリザベートに添加した。得られた混合物を、コートされたプレートを用いて 4°C で 5 時間インキュベートし、次に PBS で 2 回および完全培地で 1 回洗浄した。

T 細胞増殖検定のために、完全培地 200 μ l に 3×10^5 の T 細胞を各ウェルに添加した (T 細胞は再刺激 10~11 日後に使用した)。24時間インキュベーションした後、トリチウム化したチジンをウェルあたり 1.0 μ Ci づつ添加し、次にそのプレートをさらに 18 時間インキュベートした。試料を半自動式ハーベスターを用いて、ガラス纖維のフィルター上に収集し、チジンの取り込み量を、シンチレーションカウンターで計数することによって測定した。3 重反復測定の結果を図 7 に示した。

図 7 に示すように、T 細胞の増殖は、試験 HA307-319 ペプチド結合能を決定するのに用い得る。

特定の MIC 錠タンパク質に対する結合親和性について換算約部分をスクリーニングするための、迅速かつ効率的検定を提供することは上記の結果から明かである。したがって該方法

は換算体の広範囲の種類と、MIC 錠タンパク質と相互に作用するそれらの能力とを評価でき、および結果はこのような MIC 錠タンパク質を有する宿主中の免疫応答を調節することができると。

本明細書に記載されているすべての刊行物および特許出願は、あたかもこれらの各自の各刊行物あるいは特許出願が、特定期におよび個々に参照によって取り込まれ、示されていくとの同程度に、参照によって本明細書に援用される。

本発明は十分に記載されているので、多くの変更および改変を、請求の範囲の精神あるいは適用範囲から逸脱することなく行い得ることは、当業者にとって自明である。

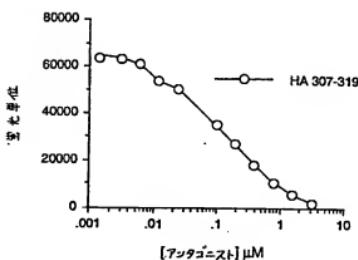


Fig. 1

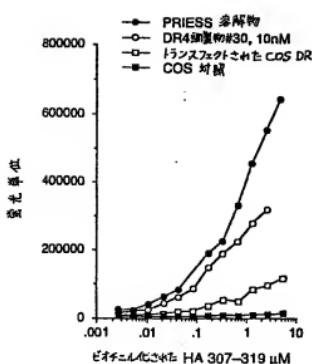


Fig. 2

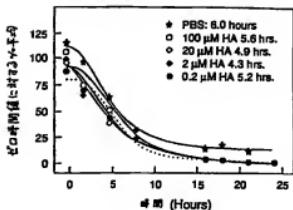


Fig. 3A

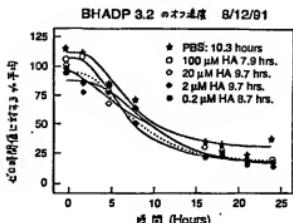


Fig. 3B

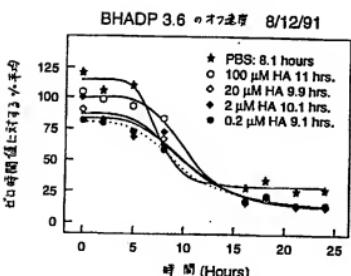


Fig. 3C

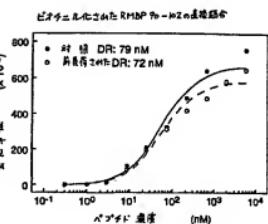


Fig. 4A

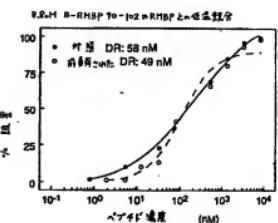


Fig. 4B

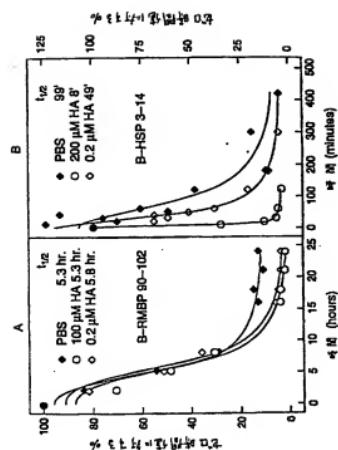


Fig. 5

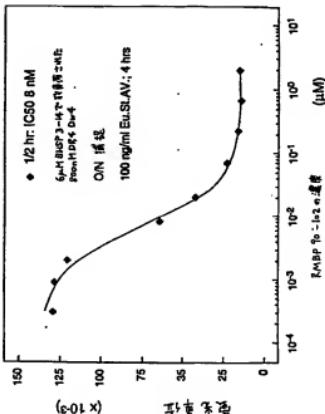


Fig. 6

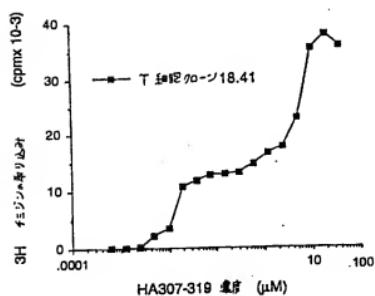


Fig. 7

* CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IN ONE OR MORE OF THE FIELDS OF INVENTION	
FIELD 1: C07K 10/00; C07K 20/00; C07K 22/00; C07K 23/00; C07K 25/00 C07C 1/00; C07F 7/00; J25B 7/00; 7/02; 7/04; 7/06; 7/08; 7/10; 7/12; 7/14; 7/16	
FIELD 2: C07K 10/00	
* INFORMATION DOCUMENTS	
Information Source	Classification Number
U.S.G.I.	43/07.21, 7.34, 7.5, 7.8, 7.9, 20; C07K 7.00, 7.12, 7.14, 7.16
Information Received after First Examination in the Form and Form Documents are Retained in the Form Source I	
* INFORMATION DOCUMENTS IN THE FIELD 2	
Information Source, U.S.G.I., which contains one or more of the subject matter in the following classification numbers	
T Science, vol. 225, issued 20 February 1987, J.L. New, "A new method for the detection of the immunogenicity of proteins", pages 83-94, See page 86, col. 2, line 16-20	1-14 and 19
T Nature, vol. 318, issued 20 July 1985, A. DODD ET AL., "Structural characteristics of an antigenic peptide from the interdomain junction of IgG1 antibody", pages 395-396, See page 395, col. 1, line 1-10	1-14 and 19
T Science, vol. 231, issued 23 March 1987, S. Rana et al., "The reduction between major haemagglutinin antigenic peptide (HA2) and minor HA2-like antigenic peptide", pages 120-123, See page 120, col. 1, line 1-10 and page 123, col. 1, line 1-2	1-14 and 19
T 15, A, 4,048,200 (FRANCE) 13 September 1987, see col. 1, lines 44-65 and col. 2, lines 1-9,	3-9
Continued on reverse sheet.	
* INFORMATION DOCUMENTS IN THE FIELD 1	
Information Source, U.S.G.I., which contains one or more of the subject matter in the following classification numbers	
21 February 1992	27 FEB 1992
Information Received in writing	Information Received in writing
12/03	David A. Sanderson

INVENTION AND APPLICANT INFORMATION		SEARCHED	SEARCHED
IN DOCUMENTS PERTINENT TO THE SUBJECT INVENTION EXCLUDING THE RELEVANT DOCUMENTS		SEARCHED	
Category	Examiner's Name	Searcher's Name	Searcher's Name
Y	US. A. 4,133,945 (GORDON ET AL) 17 October 1976. See Abstract.	19	
Y	US. A. 4,228,237 (CHEN ET AL) 14 October 1980. See col. 1, line 51-on, col. 2, line 13 and col. 3, line 40-on, 4, line 5.	54, 9 and 13-14	
Y	US. A. 4,470,446 (VAN DER HEMM ET AL) 29 October 1984. See col. 17, line 21-on.	10-14	

フロントページの続き

- (72)発明者 ロスバード, ジョナサン ピー。
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94027
アサートン, ワトキンズ アベニュー
54
- (72)発明者 ウィッカー, リンダ エス。
アメリカ合衆国 ニュージャージー
07076 スコット ブレーンズ, ブルック
サイド コート 2
- (72)発明者 キューボン, ローズ エム。
アメリカ合衆国 ニュージャージー
07023 ファンウッド, ティロットソン
ロード 5
- (72)発明者 ニコルス, エリザベス エイ。
アメリカ合衆国 ニュージャージー
07093 ウエストフィールド, グランツ
アベニュー 808

- (72)発明者 ブッシュ, ロバート
ドイツ連邦共和国 6900 ハイデルベルク
1, イン モイエンハイマー フェルト
280, ポストファッハ 101 949, ドイ
チエス クレブスフォルシュングスツエン
トルム, インスティテュート フュア イ
ムノロギー ウント ゲネティック
(72)発明者 バン シューテン, ウィム
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94304
バロ アルト, ウィリアムズ ストリー
ト 2103
- (72)発明者 ヒル, シー. マーク
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94306
バロ アルト, ルーズベルト サークル
60